

**AUS DEM MEDIZINISCHEN INSTITUT FÜR UMWELTHYGIENE
AN DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF**

Direktor : Professor Dr. med. H. - W. Schlipköter

ABTEILUNG FÜR EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

Leiter : Professor Dr. med. W. Hilscher

**Untersuchungen über die Wirkung von Cadmium auf die
Entwicklung von Ambystoma mexicanum**

**Untersuchungen über die Konzentrationen 0,3 und 0,4 ppm Cadmium
einschließlich enzymhistochemischer Untersuchungen**

D I S S E R T A T I O N

**zur Erlangung des Grades eines Dokters der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Reinhard Sattler

1983

**AUS DEM MEDIZINISCHEN INSTITUT FÜR UMWELTHYGIENE
AN DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF**

Direktor : Professor Dr. med. H. - W. Schlipköter

ABTEILUNG FÜR EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

Leiter : Professor Dr. med. W. Hielscher

**Untersuchungen über die Wirkung von Cadmium auf die
Entwicklung von *Ambystoma mexicanum***

**Untersuchungen über die Konzentrationen 0,3 und 0,4 ppm Cadmium
einschließlich enzymhistochemischer Untersuchungen**

D I S S E R T A T I O N

**zur Erlangung des Grades eines Dokters der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Reinhard Sattler

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. Brüster

Referent

gez.: Prof. Dr. med. Hilscher

Korreferent

gez.: Priv.-Doz. Dr.med.dent. Stüttgen

1. Einleitung

2. Aufgabenstellung

2.1. Allgemeine Beschreibung

2.1.1. Aufgabe: Konstruktion der Bauteile

2.1.2. Aufgabe: Zeichnung des Bauteils

2.1.3. Aufgabe: Herstellung des Bauteils

2.1.4. Aufgabe: Montage des Bauteils

2.2. Die Bedeutung der Aufgabe

2.3. Die Bedeutung der Aufgabe für die Zukunft

In Dankbarkeit

meinen lieben

Eltern

3. Technische Zeichnung

3.1. Die Darstellung der Bauteile

3.2. Die Darstellung der Bauteile

3.3. Die Darstellung der Bauteile

3.4. Die Darstellung der Bauteile

3.5. Die Darstellung der Bauteile

4. Zusammenfassung

4.1. Zusammenfassung der Bauteile

4.2. Zusammenfassung der Bauteile

4.2.1. Zusammenfassung der Bauteile

4.2.2. Zusammenfassung der Bauteile

4.2.3. Zusammenfassung der Bauteile

4.3. Zusammenfassung der Bauteile

5. Literatur

5.1. Literatur der technischen Zeichnung

5.2. Literatur der technischen Zeichnung

5.3. Literatur der technischen Zeichnung

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	1
2.1. Allgemeiner Überblick	1
2.2. Cadmium-Vorkommen in der Limnosphäre	2
2.2.1. Cadmium im Süßwasser	2
2.2.2. Cadmiumresorption, -speicherung und -ausscheidung durch Organismen	3
2.2.3. Cadmium in Süßwasserfischen	4
2.3. Die toxische Wirkung des Cadmium auf die aquatische Fauna	6
2.4. Richtwerte für Cadmium in Süßwasserfischen	7
3. MATERIAL UND METHODE	8
3.1. Das Bereitstellen der Versuchstiere	8
3.2. Die Versuchsanordnung	8
3.3. Meßmethoden zur Cadmiumbestimmung	11
3.4. Der Versuchsablauf	13
3.5. Enzymhistochemische Methoden	17
4. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	19
4.1. Statistische Ergebnisse	19
4.2. Entwicklung vom frühen Larvenstadium bis zum ersten Lebensjahr	24
4.2.1. Lebendbeobachtungen	24
4.4.2. Makroskopische Untersuchungen	24
4.3. Enzymhistochemische Ergebnisse	24
5. DISKUSSION	25
5.1. Diskussion der Versuchsbeobachtungsergebnisse	25
5.2. Diskussion der enzymhistochemischen Ergebnisse	25
5.3. Diskussion der Versuchsanordnung	26
6. ZUSAMMENFASSUNG	29

1. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche über den Einfluß von Cadmium auf die Entwicklung von *Ambystoma mexicanum* berichtet. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Einwirkung von Cadmium bei Säugetieren, in geringerem Maße bei Vögeln, vor allem aber bei Fischen untersucht wurde. Untersuchungsergebnisse über die Einwirkung von Cadmium auf den Organismus von Amphibien liegen bisher nicht vor.

Die Species *Ambystoma mexicanum* (Axolotl) wurden aus folgenden Gründen für die Untersuchungen ausgewählt:

- (1) Axolotl gehören nicht zu den in der Bundesrepublik Deutschland geschützten Arten,
- (2) für Experimente mit Schadstoffen haben Axolotl gegenüber Fischen den Vorteil, daß sie den Säugetieren verwandtschaftlich näher stehen und Extremitäten besitzen,
- (3) durch ihre Außenkiemen sind sie befähigt, sich zeitlebens im Wasser aufzuhalten; die Einwirkung eines Schadstoffes auf ihren Organismus kann daher leicht überprüft werden.

Die Versuche und Untersuchungen gliedern sich in 3 Abschnitte:

Abschnitt 1 befaßt sich mit der Entwicklung von der Eiablage bis zum frühen Larvenstadium,

Abschnitt 2 mit der Entwicklung vom frühen Larvenstadium bis zum 3. Lebensmonat bzw. bis zum 1. Lebensjahr,

Abschnitt 3 mit dem Enzymmuster der cadmiumexponierten Tiere im Vergleich zu dem der Kontrolltiere.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Allgemeiner Überblick

Cadmium (Cd) ist ein silberweißes glänzendes weiches Metall, das im Jahre 1817 von dem Göttinger Professor Stromeyer im Zinkoxid entdeckt wurde (31). Es besitzt die Ordnungszahl 48 und gehört damit zu den Elementen der zweiten Nebengruppe des Periodensystems. Sein Atomgewicht beträgt 112,40. Sein Schmelzpunkt liegt bei nur 321° C, sein Siedepunkt bei 767° C. Man setzt es deshalb oft leichtschmelzenden Legierungen zu. In der Natur kommt Cadmium fast immer zusammen mit Blei und besonders Zink vor, dem es in seinen chemischen Eigenschaften sehr ähnelt.

Cadmium ist wie Zink zweiwertig und bildet eine Reihe komplizierter Additionsverbindungen. Es ist besonders korrosionsbeständig und findet deshalb als Rostschutzmittel und für Metallüberzüge Verwendung. Neuerdings wird Cadmium zur Herstellung alkalischer Stahllakkumulatoren und zum Absorbieren langsamer Neutronen im Kernreaktor eingesetzt.

Cadmiumsulfat (CdSO_4) und Cadmiumjodid (CdJ_2) wurden früher als Augenwasser bzw. -salbe verwendet, da die beiden Verbindungen in mittleren Konzentrationen adstringierend wirken. In höheren Konzentrationen entwickeln sie jedoch einen stark ätzenden Effekt (2). Cadmiumgelb (CdS) und Cadmiumrot (CdSe) dienen häufig zum Färben von Kunst- und Gebrauchsgegenständen. Cadmiumoleat wird als Imprägniermittel eingesetzt.

Saures Füllgut setzt aus vercadmierten Konservendosen oder aus mit Cadmiumpigmenten behandelten Polyamidbehältern Cadmium weitgehend frei (8). Die Verschmutzung der Atmosphäre mit Cadmium stieg in den letzten Jahren steil an. Neuere Zahlenangaben aus den USA zeigen, daß die vor allem bei der Schrottverwertung und von Metallhütten in die Luft emittierte Cadmiummenge bereits so groß ist wie die bei der gesamten Cadmiumproduktion anfallende Menge (10).

2.2. Cadmium-Vorkommen in der Limnosphäre

2.2.1. Cadmium im Süßwasser

Der global als normal anzusehende Cadmiumgehalt von Binnengewässern liegt nach DURUM et al. (7) bei 1 bis 10 $\mu\text{g/l}$. MEISCH et al. (20) berichten über Cadmiumgehalte bis zu 12 $\mu\text{g/l}$ im Settersbach, einem Zufluß der Saar. KÖLLE et al. (14) fanden in den Jahren 1968 bis 1970 im Wasser des Niederrheins durchschnittlich 7 $\mu\text{g/l}$ sowie FÖRSTNER und MÜLLER (9) im Jahre 1972 im Durchschnitt 8,2 ppb (+++). SCHLEICHERT (29) ermittelte in Schwebstoffen aus dem Rhein Werte von 13 bis 64 ppm (***) Cadmium und aus dem Main 76 ppm Cadmium Trockensubstanz. Sedimentkerne des Bodensees wiesen Cadmiumgehalte von 0,10 bis 1,50, durchschnittlich 0,30 ppm Trockensubstanz auf (20). ROSMANN und DE LAETER (28) berichten über relativ geringe Cadmiumgehalte der Gewässer zweier großer Flußsysteme West-Australiens. Im Binnenland lagen deren Gehalte zwischen 0,02 und 0,09 $\mu\text{g Cd/l}$, in Mündungsnähe betrug der Gehalt dagegen ca. 0,11 $\mu\text{g/l}$ und war damit immer noch um den Faktor 100 niedriger als die von der WHO empfohlene maximal tolerable Cadmiumkonzentration im Trinkwasser

(***) ppm = part per million (Teil pro 1 Million)

(+++) ppb = part per billion (Teil pro 1 Milliarde)

(10 µg/l). Es dominiert dort der Ackerbau. Industrie ist nur wenig vorhanden. Die Autoren vertreten daher die Auffassung, daß die Cadmiumkontamination des Wassers beider Gewässer ausschließlich durch Phosphat- und Superphosphat-Bodendünger verursacht wird. REUSS et al. (27) konnten ebenso wie PAYER et al. (25) nachweisen, daß Phosphat- und Superphosphatdünger als Hauptquelle der Cadmiumkontamination landwirtschaftlicher Produkte anzusehen sind. Durch Auswaschvorgänge gelangt ein Teil des cadmiumhaltigen Düngers aber auch in das Grundwasser.

2.2.2. Cadmiumresorption, -speicherung und -ausscheidung durch Organismen

Die Aufnahme von Cadmium erfolgt entweder oral oder über die Lungen und beim Fisch auch über die Kiemen.

Verwertbare Ergebnisse über die durch intestinale Resorption aufgenommene Cadmiummenge erhielt man aus Retentionsmessungen und durch Gabe von radioaktiv markiertem Cadmium. Die intestinale Resorption wird beim Warmblüter durch die zugeführte Menge an Cadmium beeinflusst. Sie nimmt bei hoher Cadmiumaufnahme relativ ab (6).

Resorbiertes Cadmium verteilt sich sehr ungleich im Körper. Beim Warmblüter, also auch beim Menschen, finden sich die höchsten Konzentrationen an Cadmium immer in Niere und Leber (4, 6, 10, 16). Sie beherbergen mehr als die Hälfte des gesamten Cadmiumgehaltes im Körper (10).

Bei Fischen untersuchten CEARLEY und COLMAN (3) die Verteilung von Cadmium in den beiden Barscharten *Micropterus salmonides* (Forellenbarsch) und *Lepomis macrochirus* (Sonnenbarsch). Sie beobachteten, daß die Cadmiumgehalte in den Geweben beider Fischarten bei Erhöhung des Cadmiumgehaltes im Wohnwasser anstiegen. Die höchsten Konzentrationen fanden sie in den inneren Organen, gefolgt von den Kiemen und dem Rest der Körpergewebe. Ein Gleichgewicht zwischen den Cadmiumgehalten im Wasser und denen in den Geweben stellte sich nach ungefähr zwei Monaten ein. CALAMARI und MARCHETTI (zit. in 23) ermittelten bei Regenbogenforellen, die in Wasser mit einem Cadmiumgehalt von 50 µg/l gehalten worden waren, die Cadmiumanreicherungen in verschiedenen Organen der Fische, u. a. auch in den Kiemen. Sie fanden in den Nieren ca. 100 mal, im Blut und in der Leber der Regenbogenforellen ca. 30 mal und in den Kiemen ca. 80 mal höhere Cadmiumgehalte als im Wasser. Beim Zurücksetzen der Fische in nicht mit Cadmium kontaminiertes, sauberes Wasser nahmen die Cadmiumgehalte in den Nieren und in der Leber nach 50 Tagen und in den Kiemen binnen sieben Tagen um 50% ab.

Die biologische Halbwertszeit für Cadmium wird beim Menschen mit zehn bis 30 Jahren angegeben (26). Bei Mäusen soll sie ca. 50 Tage betragen (24).

Die Cadmiumumsetzungen laufen in den verschiedenen Organen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab. Aus den Knochen und den meisten Weichgeweben wird Cadmium nach einmaliger Zufuhr wieder langsam ausgeschieden. Am längsten verbleibt es in den Nieren (24).

2.2.3 Cadmium in Süßwasserfischen

Cadmium reichert sich im Fisch vorwiegend in Niere, Leber und Kiemen an.

MÜLLER und PROSI (22) untersuchten bei Fischen aus Neckar und Elsenz die Verteilung von Cadmium in verschiedenen Geweben des Fischkörpers. Tabelle (1) gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle (1): Durchschnittliche Cadmiumgehalte (ppb Frischgewicht) in verschiedenen Geweben von Rotaugen (*Rutilus rutilus*) aus Neckar und Elsenz (22)

	Ø Cd (ppb)	Streubreite
Niere	4690	49 bis 35340
Leber	801	16 bis 3120
Muskel	15	2,2 bis 55,4

Die höchsten Cadmiumgehalte wurden dabei in den Nieren der Fische gemessen. Es folgten die Lebern. Mit Abstand die niedrigsten Werte wies die Muskulatur auf.

Im Jahre 1972 hatten Analysen von Wasserproben aus dem Neckar unterhalb der Enzmündung ungewöhnlich hohe Cadmiumkonzentrationen bis zu 220 ppb ergeben (1). Sie veranlaßten MÜLLER und FÖRSTNER (21), dort Leber und Muskulatur verschiedener Rotaugen auf Cadmium zu untersuchen. Zum Vergleich wurden auch Fische aus dem weniger umweltbelasteten Neckarabschnitt Dilsberg-Neckarhäuser-Hof analysiert. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen sind in Tabelle (2) zusammengestellt.

Tabelle (2): Cadmiumgehalte (ppb Frischgewicht) in Neckarfischen (21)

Flußabschnitt	Fischspezies	Leber	Muskel
Neckar bei der Enzmündung	Rotauge	1950	60
Neckar fünf km unterhalb der Enzmündung	Rotauge	5150	230
Neckar zwischen Dilsberg-Neckar	Rotauge	30	5
-häuser-Hof	Flußkarpfen	5	3
	Brachse	11	5
	Laube	12	5

Seit Inbetriebnahme einer Kläranlage im Jahre 1973 in dem Industriebetrieb, der für die Cadmiumbelastung hauptsächlich verantwortlich war, normalisierten sich bei den Fischen, die unterhalb der Enzmündung im Neckar gefangen worden waren, die Cadmiumgehalte wieder. MÜLLER und PROSI (22) untersuchten dann im Jahre 1978 erneut Rotaugen aus dem Neckar. Die Cadmiumgehalte in der Muskulatur der Rotaugen hatten seit dem Bau der Kläranlage von 38 auf 15 ppb abgenommen. Dies wurde als Indiz für die Aufnahme von Cadmium aus den Sedimenten interpretiert. Zur gleichen Zeit untersuchte Rotaugen aus der Elsenz, einem weniger belasteten Neckarzufluß, wiesen geringere Cadmiumgehalte auf als Fische aus dem Neckar nahe der Enzeinmündung.

KITTELSBERGER (13) untersuchte verschiedene Fried- und Raubfischarten aus dem Oberrhein zwischen Germersheim und Gernsheim. Hier wurden Cadmiumgehalte in der Muskulatur von < 0,5 ppm bei Germersheim und < 1,0 ppm bei Gernsheim gefunden.

13 verschiedene Fischspezies aus westdeutschen Trinkwassertalsperren enthielten in der Muskulatur durchschnittlich 2 mg Cd/kg Trockensubstanz bei einem Cadmiumgehalt im Wasser der Talsperren von 1 µg Cd/l (5). In der Muskulatur von 13 Fischarten aus Kärntner Seen ermittelten WEISER et al. (32) einen durchschnittlichen Cadmiumgehalt von 39 ppb. Direkte Beziehungen zwischen dem Cadmiumgehalt der Fische und deren Alter konnten bisher nicht festgestellt werden (23). In den USA bestimmten Lucas et al. (18) bei 13 Fischarten aus dem Michigan-, Erie- und Oberer See u.a. den Cadmiumgehalt in Leber und Muskulatur. Die Fische enthielten durchschnittlich 94 ppb Cd, ihre Leber jedoch 400 ppb Cd.

2.3. Die toxische Wirkung des Cadmium auf die aquatische Fauna

Die Giftwirkung von Schwermetallen auf Fische hängt stark vom Sauerstoffgehalt, der Temperatur und dem pH-Wert im Wohnwasser ab (11). Auch die Giftwirkung von Cadmium auf Fische nimmt bei erhöhter Temperatur im Wohnwasser als Folge eines aktiveren Metabolismus bei verringertem O_2 -Angebot zu. Der Sauerstoffmangel im Wasser schränkt die Funktion der Zellen ein und macht sie damit anfälliger für Gifte. Erhöhte Wassertemperaturen begünstigen nachts eine Senkung des pH-Wertes, der zu einer weitgehenden Dissoziierung dort enthaltener Schwermetallkomplexe führt (17).

In Fütterungsversuchen mit Karpfen, deren Futter 30 bis 60 Tage lang steigende Zulagen an Cadmium erhalten hatte, konnte zunächst ein Stagnieren der Gewichtszunahme beobachtet werden. Ein Teil der Fische schwamm mit heftigen unruhigen Bewegungen und litt zeitweise unter Krampfanfällen. Ferner wurden seitliche Verbiegungen der Wirbelsäule beobachtet. Die Nieren zeigten eine Degeneration im Bereich der proximalen Tubuli. In der Leber fielen anomale schwarze Granula auf, die sich den Blutgefäßen anlagerten. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase, der Calciumgehalt im Serum und der Calciumanteil im Skelett waren vermindert. KOYAMA und ITAZAWA diskutieren für die beobachteten Veränderungen folgende Mechanismen: Die durch Cadmium verursachte Degeneration der Nierentubuli führt zu einer Störung des Verhältnisses zwischen Calcium und Phosphor. Niedrige Ca-Gehalte bedingen eine Überempfindlichkeit des Nervensystems (Krämpfe, Unruhe) und Schädigung der Wirbelsäule (15). Die Verabreichung subletaler Cadmiumdosen an Aal (*Anguilla anguilla*), Flußbarsch (*Perca fluviatilis*) und Flunder (*Pleuronectes flesus*) bewirkte bei ihnen ausgeprägte Anämien und Hyperglykämien (17).

Mit Cadmium über sechs Monate hinweg subletal vergiftete Forellen und Sonnenbarsche wiesen anomale Verhaltensmuster auf (3).

Für die Schleie beträgt die 96 h-Letalkonzentration (LD 100) etwa 20 mg/l, beim Karpfen 15 mg/l und für die einsömmrige Regenbogenforelle 4 mg Cd/l (30).

2.4. Richtwerte für Cadmium in Süßwasserfischen (12)

Die zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundesgesundheitsamtes gibt als Richtwert von 1979 für Cadmium in Süßwasserfischen 0,05 mg/kg Frischgewicht an. Ihm liegen die Cadmiumgehalte 349 untersuchter Fische zugrunde. Einzelwerte bewegen sich zwischen 0,0005 und 0,8035, das arithmetische Mittel lag bei 0,020 mg/kg Frischgewicht, sein Perzentil bei 97.

Dieser Richtwert wird lediglich empfohlen und ist nicht gesetzlich verordnet. Nach Auffassung des Bundesgesundheitsamtes sollen bei Überschreitungen durch die zuständigen Behörden Nachforschungen über die Ursachen angestellt werden. Gegebenenfalls ist auch zu prüfen, ob diese Lebensmittel zu beanstanden sind.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Das Bereitstellen der Versuchstiere

Für Untersuchungszwecke stellte das Löbecke-Museum in Düsseldorf dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf zehn weibliche und zehn männliche Tiere der Spezies *Ambystoma mexicanum* (Axolotl) zur Verfügung. Die Haltung und Aufzucht der Tiere erfolgte gemäß den Angaben und Ratschlägen von Frau Prof. Dr. A. G. Johnen, 1. Lehrstuhl für experimentelle Morphologie am Zoologischen Institut der Universität Köln.

Die Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt und bei einer Temperatur von 20°C in Leitungswasser gehalten, das fortwährend über Aktivkohle und Watte umgewälzt und mit Luft durchperlt wurde (***).

Um die Tiere zur Vermehrung zu bringen, wurden am 13.1.1982 jeweils ein Weibchen und ein Männchen in ein Aquariumbecken gesetzt. Das Wasser in diesen Becken wurde durch Eisstücke auf 15°C abgekühlt, um die Befruchtung der Eier und den Laichvorgang einzuleiten. In die Aquarienbecken wurden jeweils einige Weidenzweige gelegt, an denen die Weibchen später ihre Eier ablegen sollten. Zwei weibliche Tiere konnten dabei zum Ablaichen gebracht werden. Die Anzahl der Eier betrug insgesamt etwas über 1500. Nach den Angaben von Frau Prof. Johnen kann man pro Weibchen mit 200 bis 1000 Eiern pro Ablaichung rechnen, die in mehreren Etappen stattfindet. Die Eizahl pro Ablaichung ist altersabhängig.

3.2. Die Versuchsanordnung

In sechs Aquarienbecken aus Plexiglas kam Wasser mit verschiedenen Cadmiumkonzentrationen sowie cadmiumfreies Wasser, in

Becken 1	0,00 ppm Cd (cadmiumfreie Kontrollgruppe),
Becken 2	0,05 ppm Cd,
Becken 3	0,10 ppm Cd,
Becken 4	0,20 ppm Cd,
Becken 5	0,30 ppm Cd,
Becken 6	0,40 ppm Cd.

(***) Die Fütterung der Tiere erfolgte zweimal wöchentlich. Als Nahrung dienten kleine Stücke von Rinderherzen.

Jedes der sechs Becken wurde mit acht speziell für diesen Versuch angefertigten Einsätzen aus Plexiglas versehen. Diese Einsätze sollten es ermöglichen, Eier unterschiedlicher Abblanchetermine, bzw. geschlüpfte Tiere unterschiedlichen Alters voneinander zu trennen und trotzdem einen Wasseraustausch zu gewährleisten. Es handelte sich um Plexiglaszylinder mit einem Innendurchmesser von 100 mm. Sowohl in deren Boden als auch in den Wandungen waren Bohrungen von 2 mm angebracht, um einen Wasseraustausch zwischen Zylinderinnenseite und -außenseite zu ermöglichen.

Da die Zusammensetzung des Leitungswassers Schwankungen unterworfen ist und es auch Cadmium enthalten kann, wurde als Matrix eine cadmiumfreie Standardlösung zubereitet, welcher dann die jeweilige Cadmiumdosis beigegeben wurde. Das Rezept für dieses Standardwasser stammt aus dem Arbeitspapier 780404 der "Swedish Working Group of Standardisation of Toxicity Tests". Es lautet:

- Grundlösung 1 320 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 29 g NaCl und 9 g NaNO_3
auf 1 l mit Aqua dest auffüllen
- Grundlösung 2 151 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 79 g Na_2SO_4 auf 1 l
mit Aqua dest auffüllen
- Grundlösung 3 27 g NaHCO_3 auflösen und auf 1 l auffüllen

Je 50 ml von Lösung (1) und Lösung (2) und 500 ml von Lösung (3)
zu 100 Liter Aqua dest zugeben.

Da es darauf ankam, die jeweilige Cadmiumkonzentration über einen mehrmonatigen Zeitraum konstant zu halten, wurde zunächst die Anwendbarkeit einer Umwälzpumpe mit Aktivkohlefilter als Säuberungsgerät überprüft:

In einem Aquariumbecken mit 50 l Standardlösung wurde eine Cadmiumkonzentration von 0,40 ppm eingestellt. Diese Lösung wurde während der folgenden 96 Stunden durch eine Pumpe mit Aktivkohlefilter umgewälzt. Die Messung der Cadmiumkonzentration erfolgte zu Beginn dieses Vorversuches und weiterhin im Abstand von 24 Stunden. Wie Tabelle (3) deutlich zeigt, bewirkt das Aktivkohlefilter ein rapides Absinken der Cadmiumkonzentration.

Tabelle (3):

Zeit nach Ansetzen	Konzentration Cd
-----------------------	------------------

0 h	0,40 ppm
24 h	0,30 ppm
48 h	0,12 ppm
72 h	0,07 ppm
96 h	0,12 ppm

Da sich unter Verwendung eines solchen Filters eine einmal eingestellte Cadmiumkonzentration nicht aufrechterhalten läßt, mußte auf den Einsatz eines solchen Säuberungsgerätes verzichtet werden. Zur Anreicherung des Wassers in den Becken mit Sauerstoff erfolgte eine Durchperlung mit Luft. Die Becken wurde alle 7 Tage gereinigt und das Wasser bzw. die Lösungen ersetzt.

Zur Entsorgung des cadmiumhaltigen Wassers dienten spezielle Ionenaustauscher der Firma Behr. Die Cadmiumkonzentration wurde nach jedem Wasserwechsel erneut bestimmt. Die Proben wurden dabei jeweils 24 Stunden nach Ansetzen des Wassers entnommen, da erst dann mit einer vollständigen Verteilung des Cadmiums gerechnet werden konnte. Die Entnahme erfolgte mit Hilfe von 100 ml fassenden Kunststoffbehältern mit Schraubverschluß. Diese wurden vor Gebrauch mit 50%-iger Salpetersäure ausgekocht und mit Aqua dest ausgespült, da es bei Verwendung von Kunststoffen zur Ionenadsorption und zum Ionenaustausch kommt. Dadurch würden aber die Messungen verfälscht werden. Das Auskochen des Kunststoffes mit Salpetersäure bewirkt eine Absättigung, so daß kein Cadmium mehr aufgenommen werden kann. Aus demselben Grunde wurden die Proben unmittelbar nach der Entnahme zu einem Prozent mit Salpetersäure angesäuert. Bis zur Messung wurden die Proben im Gefrierfach aufbewahrt. Die Messungen wurden im Institut für Umwelthygiene Düsseldorf in der Abteilung Chemie (Abteilungsleiter Dr. A. Brockhaus) durchgeführt.

3.3. Meßmethoden zur Cadmiumbestimmung

Die Messungen wurden mit Hilfe der Atom-Absorptions-Spektroskopie durchgeführt. Bei der Atom-Absorptions-Spektroskopie wird die Absorption von Lichtenergie durch Atome beobachtet. Sie eignet sich zur quantitativen Bestimmung von fast 70 metallischen Elementen über einen Konzentrationsbereich von Prozentgehalten bis zu Ultraspuren. Das Wesen der Atom-Absorption ist der Übergang eines Atoms von einem niedrigen Energiezustand A in einen höheren Energiezustand B durch Aufnahme der für den Übergang erforderlichen Energie in Form von Lichtquanten. Da die Absorption von Licht durch Atome nicht nur bezüglich ihrer Größe sondern auch hinsichtlich ihrer Menge genau definiert ist, kann durch die Messung der absorbierten Lichtmenge auf die Zahl der absorbierten Atome zurückgeschlossen werden. Damit läßt sich die Atom-Absorption als quantitatives Analyseverfahren verwenden.

Ein Atom-Absorptions-Spektrometer besteht im wesentlichen aus einer Lichtquelle, die das Spektrum des interessierenden Elementes aussendet, einem Monochromator, der aus dem Spektrum die typische Wellenlänge aussondert, welche für die Bestimmung verwendet werden soll, einem Detektor, der den Photonenstrom in einen Elektronenstrom umwandelt, sowie einem Verstärker und einem Anzeigegerät. Zwischen der Lichtquelle und dem Monochromator ist die Atomisierungseinrichtung angeordnet, in der die Probe durch thermische Dissoziation in die Atome überführt wird. Als elementspezifische Lichtquelle dient eine Hohlkathodenlampe, d. i. ein mit Edelgas (Neon oder Argon) unter einem Druck von wenigen Torr gefüllter Glaszylinder, in den zwei Elektroden eingeschmolzen sind. Die Anode ist ein einfacher Draht, meist aus Wolfram oder Nickel, die Kathode hat die Form eines an einer Seite offenen Hohlzylinders und ist aus einem spektralreinen Metall gefertigt oder mit diesem gefüllt. Legt man eine Spannung (bis etwa 400 V) an die beiden Elektroden, so bildet sich eine Glimmentladung aus, d. h. das Edelgas wird bei dem herrschenden niedrigen Druck ionisiert. Die gebildeten Gasionen treffen, dem Spannungsgefälle folgend, auf die Kathode und bewirken dort eine Emission von Metallatomen, die ihrerseits wieder in der Glimmentladung angeregt werden und somit ihr Emissionsspektrum aussenden. Als Meßgerät diente das AAS 400 der Firma Perkin Elmer, als Atomisierungseinrichtung wurde die flammenlose Graphitofentechnik eingesetzt (HGA 500, Fa. Perkin Elmer).

Die zu messenden Proben wurden 1 : 10 mit HNO_3 0,01 n (Fa. Merck) in Teflongefäße (Perkin Elmer) mit cadmiumfreien Eppendorf-Pipetten verdünnt. Eichlösungen wurden in den Verdünnungen 0,0 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm 0,15 ppm und 0,5 ppm Cd angesetzt und in gleicher Weise wie die Proben verdünnt. Um Fehler bei der Herstellung der gewünschten Konzentrationen zu vermeiden, wurden die Proben und Eichlösungen zweimal angesetzt und gemessen: Dazu kamen je 20 μl der verdünnten Proben, bzw. Eichlösungen direkt in das Graphitrohr zur Pipetierung und Messung. Die Eichung erfolgte durch Cadmium-Standards in 0,01 n HNO_3 (Merck).

Geräteeinstellung: Cd-Hohlkathodenlampe bei einer Wellenlänge von 228,8 nm, D2-Kompensator, Spalt 0,7 nm, Range 1 V, Peakhöhenmessung

Die Reproduzierbarkeit innerhalb einer Analysengruppe ist kleiner als . zehn Prozent. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,01 ppm Cd.

Tabelle 4 gibt die durchschnittlichen Meßwerte während der folgenden Versuche wieder:

Tabelle (4) : Cadmiumbestimmungen während des Versuches

Für die Zeit vom 13.3.1982 bis zum 13.4.1982:

Sollwert	Istwert
0,00 ppm	<0,01 ppm
0,05 ppm	0,06 ppm
0,10 ppm	0,11 ppm
0,20 ppm	0,20 ppm
0,30 ppm	0,31 ppm
0,40 ppm	0,37 ppm

für die Zeit vom 13.4.1982 bis zum 21.2.1983:

Sollwert	Istwert
0,05 ppm	0,06 ppm

Im folgenden Text sind für die Cadmiumkonzentrationen jeweils die Sollwerte angegeben.

3.4. Der Versuchsablauf

Da die Weibchen fast zwei Tage benötigten, die Eier abzulegen, wurde der frische Laich etappenweise entnommen und auf die Aquarienbecken 1 bis 6 verteilt. Um das jeweilige Alter der Eier festzuhalten, kamen diese in die o. g. Einsätze I bis VIII. Es entstanden so innerhalb der Aquarienbecken Untergruppen von Eiern, die den verschiedenen Entnahmezeiten entsprachen. Tabelle (5) gibt die genaue Aufteilung des Laiches innerhalb der Becken wieder. Die Einsätze sind hier mit römischen Zahlen durchnummeriert.

Tabelle (5) : Laichzeiten

Einsatz	Zeitpunkt (Datum, Uhrzeit)	Anzahl der Eier
I	13.1.82, 14.00	14
II	18.00	24
III	22.00	29
IV	14.1.82, 6.00	34
V	12.00	30
VI	19.00	60
VII	15.1.82, 1.00	50
VIII	8.00	20

Dies bedeutet, daß z. B. am 14.1.1982 um 6 Uhr die Einsätze IV aller Becken mit jeweils 34 Eiern bestückt wurden.

Nachdem der gesamte Laich in der beschriebenen Weise auf die Becken verteilt worden war, wurde unter ständiger Beobachtung der Eier auf das Schlüpfen der Tiere gewartet. Durch die Gallerte hindurch läßt sich das Heranwachsen eines Keimlings verfolgen. Auch spezielle Entwicklungsstadien wie z. B. das Morula- oder Gastrulastadium sind erkennbar.

Bei insgesamt 261 Eiern traten vom 16.1.1982 bis zum 17.1.1982 Trübungen der Gallerthülle auf, ohne daß eine Furchungsteilung erfolgt war. Diese Eier wurden als unbefruchtet angesehen und eliminiert, wie Tabelle (6) wiedergibt.

Tabelle (6) : Aussortierte ungefurchte Eier

	Becken	Kontrolle	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
Kompartiment							
I		1	1	1	0	2	1
II		0	2	4	8	3	4
III		1	1	1	1	0	1
IV		2	7	1	2	5	10
V		7	4	4	7	4	6
VI		8	10	4	13	17	12
VII		12	13	13	11	17	12
VIII		3	6	1	6	8	4

In gleicher Weise traten vom 25.1.1982 bis zum 7.2.1982 Trübungen der Gallerthülle makroskopisch erkennbarer Embryonen auf. Diese wurden als abgestorbene Embryonen aussortiert, s.Tabelle (7).

Tabelle (7): Aussortierte abgestorbene Embryonen

	Datum	25.1	30.1.	31.1.	1.2.	2.2.	3.2.	4.2.	5.2.	6.2.	7.2.
Becken											
0.00			1	2	1	1					
0,05				1	2	1					
0,10					1						1
0,20			2	3	1	4					
0,30			1	1	8	5					
0,40		2	2	4	3			1			

Vom 26.1.1982 bis zum 3.2.1982 verließen die Feten ihre Gallerte. Diese wurden als "geschlüpft" in Tabelle (8) registriert.

Vom 30.1.1982 bis zum 10.4.1982 wurden tote Tiere festgestellt. Diese Individuen wurden entfernt wie Tabelle (9) zeigt. Einige dieser Kadaver wiesen Verletzungen auf.

Tabelle (9)

Datum	30.1.	31.1.	1.2.	2.2.	3.2.	4.2.	5.2.	6.2.	7.2.	8.2.	9.2.	10.2.	11.2.	12.2.	13.2.	14.2.	15.2.	16.2.	17.2.	18.2.	19.2.	20.2.	21.2.	22.2.	23.2.
Kontr			1	1			1	1	1								1		1	1			1		
0,05		2	1	2		1											1		2						
0,10																	1	2							
0,20												1	2				1					1	3		3
0,30	2	1	1	1	1	1	1				1						1	1		2	1	1	1	1	2
0,40		6		2	1	2	1				1		2							2	3		1	3	2

Datum	24.2.	25.2.	26.2.	27.2.	28.2.	1.3.	2.3.	3.3.	4.3.	5.3.	6.3.	7.3.	8.3.	9.3.	10.3.	11.3.	12.3.	13.3.	14.3.	15.3.	16.3.	17.3.	18.3.	19.3.	20.3.
Kontr			1			1	1		1						1	2			1						1
0,05									5	1	1	2						1	1				1		1
0,10	1	1	3	1			3		1									1			2	5		1	1
0,20		1			1	1						2						1					1		1
0,30		2		2			3				2	2	17	4	3			6	2		3		1		1
0,40	1		6				2			5	2				20	4	3			3			1		1

Datum	21.3.	22.3.	23.3.	24.3.	25.3.	26.3.	27.3.	28.3.	29.3.	30.3.	31.3.	1.4.	2.4.	3.4.	4.4.	5.4.	6.4.	7.4.	8.4.	9.4.	10.4.	11.4.	12.4.
Kontr		1						1						2			6						
0,05		1											1								1		
0,10																1							
0,20																1							
0,30																1							
0,40			1													1							

Zum Ende des ersten Versuchsabschnittes nach drei Monaten wurden am 13.4.1982 sämtliche Tiere einzeln gewogen. Die Durchschnittsgewichte sind in Tabelle (11) enthalten.

Danach wurden am 13.4.1982 alle Tiere bis auf 50 Individuen aus der 0,05-ppm-Gruppe und 50 Tiere der Kontrollgruppe getötet. Dabei wurden die jeweils 50 größten Tiere weitererhalten und weiterbeobachtet. Von den getöteten Tieren wurden 15 Individuen aus der Gruppe 0,40 ppm und 15 Individuen der Kontrollgruppe eingefroren und für enzymhistochemische Untersuchungen herangezogen.

3.5. Enzymhistochemische Methoden

Zur histochemischen Enzymdarstellung wurden die Tiere mit MABA (Methansulfonat des Metaaminobenzoesäureäthylesters) betäubt und unmittelbar danach als ganzes in flüssigem Stickstoff (-190°C) für etwa drei bis vier Minuten schockgefroren und in Plastiktüten in einer Tiefkühltruhe bei -70°C aufbewahrt.

Bei etwa -20°C wurden 8-10 μm dicke Kryostatschnitte angefertigt. An den so hergestellten Kryostatschnitten wurden folgende Enzymreaktionen durchgeführt:

1. Oxidoreduktasen: Lactatdehydrogenase
2. Hydrolasen : a) Alkalische Phosphatasen
b) Saure Phosphatasen
c) Unspezifische Esterasen

Die Oxidoreduktasen (Dehydrogenasen) oxidieren ihr Substrat unter Abspaltung von Wasserstoff. Diesen übertragen sie auf einen geeigneten Akzeptor. In den meisten Fällen ist der Akzeptor ein Coenzym wie NAD, NADP oder FAD. Der Wasserstoff wird dann entweder über ein Wasserstofftransportsystem weitergeleitet, bis er schließlich mit Sauerstoff reagiert, oder er wird in anderen enzymatischen Prozessen verwendet. Hydrolasen katalysieren folgende Reaktion: $\text{AB-H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{AH-BOH}$. Meist überwiegt die Spaltungsreaktion. Es ist aber auch der umgekehrte Weg möglich; dann läuft eine Synthese unter Freisetzung von Wasser ab. Hydrolasen können je nach Substrat in mehrere Gruppen eingeteilt werden. Es wurden untersucht die Gruppe der Phosphatasen und Esterasen.

Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt eingerichtet:

1. Lactatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.27)

Substrat: Na-DL-Lactat

Akzeptor: TNBT

Inkubationszeit: 45 Minuten

Temperatur: 37°C

pH: 7,3

2a) Alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1)

Azokupplungsverfahren nach Burstone (1962)

Substrat: Naphtol-ASM-X-Phosphat

Kuppler: Hexazotiertes Neufuchsin

pH: 8,3

Inkubationszeit: 30 Minuten

Temperatur: 37°C

2b) Saure Phosphatase (E.C. 3.1.3.2)

Simultane Azokupplung nach Barkar-Anderson (1962)

Substrat: Naphtol-ASTR-Phosphat

Kuppler: Hexazotiertes Pararosanilin

Inkubationszeit: 30 Minuten

pH: 5,0

Temperatur: 37°C

2c) Unspezifische Esterase (E.C.3.1.1.1; E.C.3.1.1.2 ; E.C.3.1.1.6)

Simultane Azokupplung

Substrat: 1-Naphtol-Azetat

Kuppler: Hexazotiertes Pararosanilin

Inkubationszeit: 30 Minuten

Reaktion bei Zimmertemperatur

pH: 6,5

4. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

4.1. Statistische Ergebnisse

Die Versuchsprotokolle, Tab.(5), Tab.(6), Tab.(7), Tab.(8) und Tab.(9), lassen sich in einer Bilanz zusammenfassen, siehe Tabelle (10).

Diese Bilanz enthält für jede Konzentrationsgruppe eine THEORETISCHE ÜBERLEBENSZAHL -TZ-, die einen rechnerischen Sollwert darstellt, sowie die tatsächlich gefundene REALE ÜBERLEBENSZAHL -RZ-. Die TZ gibt an, wieviele Tiere aufgrund der registrierten toten Tiere erwartungsgemäß am 12.4.1982 noch hätten leben müssen, d.h. die TZ ist gleich der Anzahl der geschlüpften Larven -SZ- minus der Anzahl der gestorbenen Tiere -Z-.

$TZ = SZ - Z$

Tatsächlich aber fand sich eine RZ, die niedriger war als die errechnete TZ (Tab.10). Diese Differenz ist bei allen Versuchsgruppen einschließlich der Kontrollgruppe dadurch bedingt, daß größere Tiere wesentlich kleinere fressen (Kannibalismus). In der 0,20-ppm-Gruppe war der Kannibalismus besonders stark ausgeprägt (Tab.10). Daß einige Larven bzw. Tiere in ihrer Körpergröße ihre gleichaltrigen Nachbarn um ein Mehrfaches übertrafen, ist hauptsächlich auf den beobachteten Kannibalismus zurückzuführen. Schon ein geringfügig größeres Tier ist in der Lage, einen schwächeren Artgenossen zu fressen.

Neben Kannibalismus wurden Verletzungen überlebender Tiere an Rumpf und Extremitäten beobachtet.

Tabelle (10) Bilanz bis 12.4.1982

Konzentrations- gruppe	Kontr.	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
Zu Versuchsan- fang eingesetzte Eier (s.Tab.5)	250	250	250	250	250	250
Aussortierte un- gefurchte Eier (s.Tab.6)	34	44	29	48	56	50
Aussortierte ge- furchte Keimlinge (s.Tab.7)	5	4	2	10	15	12
Geschlüpfte Larven -SZ- (s.Tab.8)	211	202	219	193	180	189
Aussortierte tote Tiere - Z- (s.Tab.9)	25	28	33	31	50	88
Theoretisch über- lebende bis 12.4. 1982 -TZ-	186	174	186	162	130	101
Tatsächlich über- lebende bis 12.4. 1982 -RZ-	173	155	185	125	129	101
Differenz	13	19	1	37	1	0

Diese Bilanz in Tabelle (10) enthält eine Zusammenfassung der Versuchsprotokolle, s.a. Tabellen (5) bis (9). Sie ermöglicht einen Überblick über die Anzahl der Individuen, ohne den genauen chronologischen Versuchsablauf darzustellen.

Trotz der beobachteten scheinbar "unspezifischen" Reduzierung der Eier und entstehenden Keimlinge durch Nichtbefruchtung, bzw. Befall durch Mikroorganismen und Pilze ist aus den Tabellen (10), (11) und (12) ein Zusammenhang zwischen Cadmiumdosis und Wachstum der Tiere erkennbar, der auf die Toxizität des Cadmium zurückgeführt wird: Es ergibt sich bei den aussortierten Embryonen bzw. Keimlingen der höheren Konzentrationen eine höhere Sterblichkeit als bei den niedrigeren Dosen und den Kontrollkeimlingen. Die Zahl der jeweils geschlüpften Larven dokumentiert eine klar erkennbare Abhängigkeit von der Cadmiumkonzentration, s.a. "prozentuale Schlüpftrate" in Tabelle (11). Daraus folgt, daß eine toxische Cadmiumeinwirkung per diffusionem durch die Gallerthülle der Axolotl hindurch besteht. Die Zahl der geschlüpften Larven, die abstarben und als "aussortierte tote Tiere" in Tabelle (10) registriert sind, weisen ebenfalls auf eine Abhängigkeit von der Cadmiumkonzentration, s.a. Tabelle (12), hin, dies ist auch in Tabelle (11) als "prozentuale Überlebensrate" festgehalten.

Daraus folgt, daß chronisch bestehende Cadmiumkonzentrationen in einer Größenordnung von 0,05 ppm bis 0,40 ppm für frei schwimmende Larven der Spezies *Ambystoma mexicanum* toxisch sind, daß sich bereits ein Konzentrationsunterschied von 0,05 bis 0,10 ppm in der Überlebensrate auswirkt, und daß die LD50 für diese Larve bei etwa 0,40 ppm liegen dürfte, s.a. Tabelle (11), welche 53% Überlebensrate bei 0,40 ppm ausweist.

Eine weitere Betrachtung gilt dem zeitlichen Ablauf der Individualentwicklung. Wie Tabelle (11) zeigt, schlüpfen die Larven um so eher, je höher die Cadmiumkonzentration ist, s.a. Graphik (1). Wie auf Seite 17 erwähnt, wurden auch die Körpergewichte der überlebenden Tiere festgehalten, s. Tabelle (11). Die Tiere der Kontrollgruppe und der 0,05 ppm-Gruppe weisen ein um 50% höheres Durchschnittsgewicht auf als ihre Artgenossen aus den höher dosierten Gruppen. Zwischen den Gruppen mit 0,10 ppm, 0,20 ppm und 0,40 ppm bestehen nahezu keine Gewichtsunterschiede. Es ist zu erwarten, daß es zwischen 0,05 ppm und 0,10 ppm eine Grenzkonzentration gibt, von der ab sprunghaft eine erhebliche Beeinträchtigung des Wachstums erfolgt. Dementsprechend sagt eine Korrelation mit einer Signifikanz von $p=0.009$, wie in Grafik (2) dargestellt, nicht unbedingt etwas über die Linearität einer Beziehung aus. Während der Versuche wurde das allgemeine Verhalten der Larven und Tiere beobachtet. Am deutlichsten waren die Unterschiede zwischen Keimlingen der 0,40 ppm-Gruppe und den Kontrollkeimlingen. Die Keimlinge mit der hohen Cadmiumdosis verließen zwar im Durchschnitt eher ihre Gallerte, waren aber kleiner als die Kontrolllarven. Sie waren in ihrem allgemeinen Verhalten und auch bei der Nahrungsaufnahme träger, zeigten also eine reduzierte Appetenz. Die beobachteten Gewichtsunterschiede sind mithin teilweise auf verminderte Nahrungsaufnahme zurückzuführen.

Statistische Ergebnisse aus dem Versuchsablauf bis zum 12.4.1982
Tabelle (11)

Cd-Konzentration 0,00 0,05 0,10 0,20 0,30 0,40
in ppm

Schlüpfrate % 84 81 88 77 72 76

Embryonale
Entwicklungszeit
bis zum Schlüpfen
in h 394 370 389 360 348 335

tatsächliche
Überlebensrate % 82 77 84 65 70 53

theoretische
maximale
Überlebensrate % 88 86 85 84 70 53

Durchschnitts-
gewicht aller am
12.4.1982 noch
lebenden Tiere
in Gramm 0,98 0,93 0,64 0,61 0,62 0,64

Anmerkung zu Tabelle (11)

Die Schlüpfrate gibt an, wieviele Tiere, bezogen auf die zu Versuchsanfang eingesetzte Anzahl von Eiern, die Gallerte verlassen haben. Welche Zeit dazu von den Larven einer bestimmten Konzentration benötigt wurde, ergibt sich aus der zweiten Zeile. Die "tatsächliche Überlebensrate" gibt den prozentualen Anteil der am 12.4.1982 noch lebenden Tiere an der Anzahl der geschlüpften Larven wieder. Die "theoretische maximale Überlebensrate" ergibt sich aus der Zahl der theoretisch überlebenden Tiere, bezogen auf die Anzahl der geschlüpften Keimlinge. Die weiteren Erklärungen hierzu sind dem Text zu entnehmen.

Für die Zusammenhänge der Effekte auf die Larven mit der Cadmiumdosis sowie für die Abhängigkeiten der Effekte untereinander wurden die Korrelationen und deren Signifikanzen errechnet.

Tabelle (12): Korrelationen der Befunde

	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)
(A)	-	0.7714 p=0.036 *	0.7143 p=0.055	-0.7714 p=0.036 *	-0.9429 p=0.002 **	-0.6000 p=0.104	-0.7714 p=0.036 *	-0.8857 p=0.009 **
(B)		-	0.9429 p=0.002 **	-1.0000 p=0.001 ***	-0.8857 p=0.009 **	-0.3714 p=0.234	-0.8286 p=0.021 *	-0.6571 p=0.078
(C)			-	-0.9429 p=0.002 **	-0.7714 p=0.036 *	-0.4286 p=0.198	-0.7714 p=0.036 *	-0.6000 p=0.104
(D)				-	0.8857 p=0.009 **	0.3714 p=0.234	0.8286 p=0.021 *	0.6571 p=0.078
(E)					-	0.4857 p=0.164	0.8857 p=0.009 **	0.7714 p=0.036 *
(F)						-	0.2000 p=0.352	0.7143 p=0.055
(G)							-	0.4286 p=0.198
(H)								-

Anzahl der verglichenen Gruppen: 6

Parameter: (A) Dosis
 (B) % ungefurchte Eier
 (C) % abgestorbene Embryonen
 (D) % geschlüpfte Larven
 (E) Mittlere Dauer der Embryonalentwicklung
 (F) % gefressene Jungtiere
 (G) % überlebende Tiere nach 3 Monaten
 (H) Mittleres Gewicht der überlebenden Jungtiere

4.2. Entwicklung vom frühen Larvenstadium bis zum ersten Lebensjahr

4.2.1. Lebendbeobachtungen

Wie auf Seite 17 erwähnt, wurden 50 Larven bzw. Tiere der 0,05 ppm-Gruppe und 50 Kontrolltiere über einen längeren Zeitabschnitt beobachtet. Die nach einer Zeit von zwölf Monaten festgehaltenen Überlebenszahlen und Körpergewichte gibt Tabelle (13) wieder.

Tabelle (13) Überlebenszahlen und Körpergewichte einjähriger Tiere am 21.2.1983

	Durchschnittsgewicht (g)	Überlebenszahl
0,05 ppm	43	19
Kontrolle	44	21

Wie Tabelle (13) zeigt, ergaben sich beim Langzeitversuch nach Ablauf eines Jahres zwischen den Kontrolltieren und der 0,05 ppm-Gruppe bezüglich der Überlebenszahlen und der Körpergewichte nur geringe Unterschiede. Eine größere Signifikanz war dagegen während der Individualentwicklung zu beobachten.

Daraus geht hervor, daß die toxische Cadmiumwirkung im Bereich von 0,05 ppm auf *Ambystoma mexicanum* bei heranwachsenden Tieren geringer ist als auf deren Embryonen und Larven.

4.2.2. Makroskopische Untersuchungen

Von den Tieren, die während des Langzeitversuches starben, wurden sowohl Kontrolltiere als auch Tiere der 0,05 ppm-Gruppe makroskopisch untersucht. Bei der äußeren Inspektion fiel auf, daß die Außenkiemen sämtlicher Versuchstiere im Gegensatz zu denen der Elterntiere schwach ausgebildet waren. Eine weitere Veränderung stellten ausgedehnte Ödeme dar, die bei einigen Tieren sowohl der 0,05 ppm-Gruppe als auch der Kontrollgruppe auftraten.

4.3. Enzymhistochemische Ergebnisse

Es wurden 15 Tiere aus der höchsten Konzentrationsgruppe, 0,40 ppm, und 15 Tiere aus der Kontrollgruppe enzymhistochemisch untersucht, genaues Vorgehen s. S. 17 f. An den Kryostatschnitten dieser Tiere wurden folgende Enzymreaktionen durchgeführt: Lactatdehydrogenase, alkalische Phosphatase, saure Phosphatase und unspezifische Esterase. Es wurden Leber, Niere und Darm untersucht. Ein Vergleich der Aktivitätsintensität sowie der Ausdehnung der Reaktionszonen der untersuchten Enzyme ergab keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

5. DISKUSSION

5.1. Diskussion der Versuchsbeobachtungsergebnisse

Wie die Untersuchungen ergaben, führte die Einwirkung von Cadmium zu einer Verkürzung des Zeitintervalls zwischen Eiablage und Schlüpfen der Larven, zu einer signifikanten Gewichtsabnahme und zu einer signifikant höheren Absterberate in der 0,40 ppm-Gruppe. Zwischen Eiablage und Schlüpfen der Larven finden normalerweise folgende Entwicklungsschritte statt:

(1) die Blastogenese mit (a) Furchungsstadium (Bildung der Morula aus der Cygote, (b) Blastulastadium (Bildung einer Hohlkugel aus Ectoderm und Entoderm und Entstehung der morphogenetischen Felder),

(2) die Embryogenese mit (a) Gastrulationsstadium (Periode der Bildung des Chordamesoderms und des Urdarms), (b) Neurulationsstadium (Bildung des Neuroectoderms und Entstehung von Rückenmark und Gehirn sowie der Kiemenanlagen), (c) Schwanzknospenstadium (Bildung des Schwanzes und der Kiemen).

Eine Ursache für das vermehrte Absterben der Larven in der 0,40 ppm-Gruppe konnte nicht gefunden werden. Dies wird weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben müssen.

5.2. Diskussion der enzymhistochemischen Ergebnisse

Die Untersuchungen der Enzyme Lactatdehydrogenase, unspezifische Esterase, alkalische und saure Phosphatase in den Organen Niere, Leber und Darm der drei Monate alten Jungtiere ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der 0,40 ppm-Gruppe und der Kontrollgruppe. Möglicherweise reagieren diese Enzyme noch nicht bei den angewandten Konzentrationen. Grundsätzlich gelten gerade die alkalischen Phosphatasen als sensibel gegenüber der Einwirkung von Cadmium. Es müßten also die hier durchgeführten enzymhistochemischen Untersuchungen durch weitere mit anderen Enzymen und/oder höheren Cadmiumkonzentrationen und/oder längeren Versuchsdauern ergänzt werden.

5.3. Diskussion der Versuchsanordnung

Die vorliegenden Versuche und Untersuchungen, die als Pilotstudie für weitere Experimente mit Eiern, Embryonen, Larven und adulten Tieren der Spezies *Ambystoma mexicanum* gedacht waren, hatten u.a. vor allem den Zweck, versuchsbedingte Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten bei der Aufzucht der Keimlinge unter normalen und pathologischen Bedingungen (Einwirkung einer Noxe) zu eruieren. Folgende Einzelheiten sollen in diesem Zusammenhang diskutiert werden:

(1) Weibchen, die längere Zeit nicht mit Männchen gepaart wurden, enthalten eine größere Anzahl überalteter Eier, die nicht befruchtet werden können. Solche Eier bleiben ungefurcht, die umgebende Gallerte trübt sich. Der Befall dieser Eier mit Mikroorganismen stellt eine mögliche Gefahrenquelle für benachbarte befruchtete und sich furchende Eier bzw. Keimlinge dar, die ihrerseits infiziert werden können. Sie belasten die Statistik, da sie eliminiert werden müssen und die ursprünglich vorgesehene Anzahl der bewertbaren Eier pro Gruppe reduzieren. Da die im vorliegenden Versuch verwendeten Weibchen bereits ein Jahr zuvor gepaart worden waren, konnte man annehmen, daß überaltete Eier in größerer Anzahl nicht abgelegt wurden.

(2) Die von vielen Tierhaltern und Experimentatoren für die Eiablage und -anheftung benutzten Weidenzweige stellen möglicherweise eine Infektionsgefahr für die sich furchenden Keimlinge dar. Es ist denkbar, daß die Keimlinge beim Abstreifen von den Zweigen verletzt oder infiziert werden. Abhilfe würde die Verwendung von glatten sauberen Kunststoffstäbchen statt der Zweige schaffen. Allerdings können die Eier dann nicht mehr so gut befestigt werden, wie dies bei Zweigen der Fall ist.

(3) Bei der Herstellung der gewünschten Cadmiumkonzentration und ihrer Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung ergaben sich Fehlermöglichkeiten, die 1. durch Adsorption von Cadmium an die Beckenwand und 2. durch Verdunstung von Wasser bedingt waren.

Um die Adsorption von Cadmium durch die Aquarienwandung zu vermeiden, wurden die benutzten Becken einige Zeit vorher durch die entsprechenden Konzentrationen abgesättigt.

Ferner stellten die Aquarienbecken offene Systeme dar, so daß es zu einer mehr oder weniger starken Verdunstung kam. Diese bewirkte eine zunehmende Konzentration nicht nur des Cadmiums sondern auch aller

anderen Elektrolyte. Es konnten aber nicht nur Stoffe entweichen, sondern auch Teilchen in das System eintreten. So mußte mit einer möglichen Kontamination der verwandten Flüssigkeiten durch Staub gerechnet werden. Solche Störfaktoren könnten durch ein "geschlossenes System" weitgehend ausgeschaltet werden. Dies war aber bei dem vorliegenden Versuch nicht praktikierbar, da die Tiere Luft benötigten, einer häufigen Fütterung bedurften und ein Wasserwechsel gewährleistet werden mußte.

Diese in Bezug auf eine genaue Cadmiumkonzentration genannten Fehler hätten sich ausgleichen lassen, wenn es möglich gewesen wäre, die Konzentrationen fortlaufend oder zumindest in kurzen Zeitabständen zu bestimmen. Die ermittelten Abweichungen hätten sich dann sofort abstellen lassen. In der vorliegenden Studie wurden die Proben etwa einen Monat nach Entnahme analysiert, wodurch nur verzögert auf die Meßwerte reagiert werden konnte. Die Ursache hierfür waren die sehr zeitaufwendigen Messungen.

(4) In der Versorgung der heranwachsenden Larven mit adäquater Nahrung traten Engpässe auf, die hauptsächlich jahreszeitlich bedingt waren. Die Tiere wurden zunächst mit *Artemia salina* und später mit *Tubifex* gefüttert. Die Salinenkrebsechen erwiesen sich in der ersten Zeit als sehr geeignetes Futter. Bei allen Tieren konnte ein rasches Wachstum beobachtet werden. Nach zwei Wochen wurde zusätzlich *Tubifex* gefüttert, eine weitere Woche später wurde nur noch *Tubifex* gegeben. Dabei wurde beobachtet, daß es gerade für kleine Tiere im Gegensatz zu den größeren schwierig war, die Würmer zu fressen. Die Bedingungen waren demnach für große Tiere besser als für kleine. Größenunterschiede der Tiere innerhalb einzelner Aquarien, aber auch Unterschiede in Bezug auf verschiedene Cadmiumkonzentrationen wurden auf diese Weise begünstigt. Eine feinere Abstufung der Fütterung durch die Verwendung von Wasserflöhen hätte diesem Effekt entgegengewirkt. Der Versuch, solche Futtertiere im Winter zu erwerben oder in Tümpeln selbst zu fangen, scheiterte. Im Umgang mit den kleinen Larven mußte darauf geachtet werden, daß diese sich nicht in den Löchern der beschriebenen Einsätze oder in den Nahtstellen der Aquarien verletzten. In kommenden Versuchen sollte eine Bedeckung dieser "Schwachstellen" durch Gaze erwogen werden.

(5) Durch Engpässe in der Ernährung, aber auch durch zu dichte Haltung der heranwachsenden Larven und Jungtiere können Anfraß von Kiemen, Extremitäten und Schwanz sowie Kannibalismus gefördert werden, wobei meistens schwächliche Larven und Jungtiere betroffen sind. Der auf Seite 19 beschriebene Kannibalismus erschwert die Erstellung einer Statistik. Besonders dessen unterschiedliches Ausmaß in den einzelnen Konzentrationsgruppen bereitete Schwierigkeiten. So fehlten zu Versuchsende in der 0,20 ppm-Gruppe 22% der Versuchstiere (s. Spalte "Differenz" in Tabelle 10), während in der 0,40 ppm-Gruppe alle Tiere vorhanden waren. Eine alleinige Betrachtung der Überlebenden brächte ein falsches Ergebnis. Daher ist auch die Anzahl der toten Tiere genau protokolliert und die Anzahl derjenigen Tiere errechnet worden, welche ohne den Kannibalismus noch leben könnten. Abhilfe würde bei neuen Versuchen ein noch intensiveres Füttern und ein noch größeres Platzangebot für die Tiere schaffen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Cadmium auf die Urodelenart *Ambystoma mexicanum* untersucht. Etwa 1500 frisch abgelaichte Eier wurden in sechs Gruppen aufgeteilt und außer den Eiern der Kontrollgruppe unterschiedlichen Cadmiumkonzentrationen von 0,05 ppm bis 0,40 ppm ausgesetzt. Die aus den Eiern hervorgehenden Keimlinge wurden bis zum Schlüpfen in Abständen von 3 Stunden beobachtet, die geschlüpften Larven bis zum Ende des 3. Monats aufgezogen. 50 Tiere der Kontrollgruppe und 50 Tiere der Versuchsgruppe, die im Wasser mit der 0,05 ppm Konzentration aufgezogen worden waren, wurden ein Jahr lang beobachtet. Ferner wurden enzymhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Dabei ergab sich eine statistisch signifikante Abhängigkeit

(1) des Zeitintervalls zwischen der Eiablage und dem Schlüpfen der Larven,

(2) der Überlebensrate,

(3) des Durchschnittsgewichtes

von der Cadmiumkonzentration.

Während sich das Zeitintervall zwischen Eiablage und dem Schlüpfen der Larven mit steigender Cadmiumkonzentration verkürzte, nahm die Zahl der überlebenden Larven und deren Gewicht deutlich ab. Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen dürfte die LD50 der Larven bei ca 0,40 ppm Cadmium liegen.

Im Zeitintervall zwischen dem Schlüpfen der Larven und dem Ende des 3. Monats starben in der 0,40 ppm-Gruppe signifikant mehr Larven ab als in der Kontrollgruppe (Tabelle 11). Signifikante Gewichtsunterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Cadmiumgruppen betrafen hingegen nicht nur die 0,40 ppm-Gruppe, sondern auch die 0,30 ppm-, die 0,20 ppm- und die 0,10 ppm-Gruppe (Tabelle 11). Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der 0,05 ppm-Gruppe hinsichtlich der Absterberate waren von Anfang an sehr gering.

Es wird gefolgert, daß das Embryonal- und frühe Larvenstadium die gegen eine Einwirkung von Cadmium empfindlichste Entwicklungsperiode darstellt.

Die enzymhistochemischen Untersuchungen der nach drei Monaten getöteten Tiere ergaben keine Unterschiede zwischen Cadmium-exponierten und Kontrolltieren.

7. LITERATUR

- (1) Banat, K., Förstner, U. & Müller, G.:
Schwermetalle in Sedimenten von Donau, Rhein, Ems, Weser und
Elbe im Bereich der Bundesrepublik Deutschland
Die Naturwissenschaften 59, 12 (1972).
- (2) Blume-Bonn, W.:
Kadmium
in Handbuch der experimentellen Pharmakologie 3. Band, 3.
Springer Verlag, Jena (1934).
- (3) Cearly, J. & Coleman, R.:
Cadmium toxicity and bioconcentration in largemouth bass and bluegill
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 11, 146. Springer Verlag, New York (1974).
- (4) Cousins, R., Barber, A. & Trout, J.:
Cadmium toxicity in growing swine
J. Nutr. 103, 964 (1973).
- (5) Dietz, F. & Koppe, P.:
Untersuchungen über den Gehalt an Schwermetallen in Süßwasserfischen
Veröffentl. Inst. Küsten- und Binnenfischerei, Hamburg, 53, 44 (1972).
- (6) Doyle, J.J., Pfander, W.H., Grebing, S.E. & Pierce, J.O.:
Effect of dietary cadmium on growth, cadmium absorption and
cadmium tissue levels in growing lambs
J. Nutr. 104, 160 (1974).
- (7) Durum, W.H., Hem, J.D. & Heidel, S.C.:
Reconnaissance of selected minor elements in surface waters
of the United States
U.S. Geol. Surv. Circ. 643, 49 Washington (1971).
- (8) Engst, R.:
Fremdstoffe in Nahrung und Ernährung
Ernährungsforschung 13, 4, 614 Berlin (1968).
- (9) Förstner, W. & Müller, G.:
Schwermetalle in Flüssen und Seen als Ausdruck der Umweltverschmutzung
Springer Verlag Berlin, New York (1974).

(10) Friberg, L:

Deposition and distribution of cadmium in man in chronic poisoning
Arch.Industr.Health 16, 27 (1957).

(11) Haberer, K. & Norman, S.:

Metallspuren im Wasser, ihre Herkunft, Wirkung und Verbreitung
Jahrbuch " Vom Wasser " 38, 157 (1971).

(12) Käferstein, F.K., Altmann, H.J. & Kallischnigg, G.:

Blei, Cadmium und Quecksilber in und auf Lebensmitteln
ZEBS-Berichte
1,(1979).

(13) Kittelsberger, F.:

Beitrag zur Rückstanduntersuchung bei Fischen
Tierärztl.Praxis 1, 465, München (1973).

(14) Kölle, W., Dorth, K., Smircz, G. & Sontheimer, H.:

Aspekte der Belastung des Rheins mit Schwermetallen
Jahrbuch " Vom Wasser " 38, 183 (1971).

(15) Koyama, J. & Itazawa, Y.:

Effects of oral administration of cadmium on fish;
I. Analytical results of the blood and bones,
II. Results of morphological examination
Bull.Japan.Soc.Scientific Fisheries 43, 523 (1977).

(16) Kreuzer, W., Sansoni, B., Kracke, W. & Wißmath, P.:

Kadmium in Fleisch und Organen von Schlachttieren
Die Fleischwirtschaft 55, 387 (1976).

(17) Larsson, A:

Some biochemical effects of cadmium on fish
Chem.Aquat.Anim. Proceedings Swed. Neth. Symposium 3, 13
(1975).

(18) Lucas, H.F., Edington, D.N. & Colby, J.R.:

Concentrations of trace elements in Great Lake fishes
J.Fish Res. Board Canada 27, 4 (1970).

(19) Meisch, H.U., Reinle, W. & Bielig, H.J.:

Schwermetallgehalte in Wässern und Schwebestoffen der Saar
Dtsch.Gewässerkdl.Mitt. 21, 27 (1977).

- (20) Müller, G.:
Schadstoffuntersuchungen an datierten Sedimentkernen aus dem Bodensee
Zeitschr.Naturforsch. 32c, 913 (1977).
- (21) Müller, G. & Förstner, U.:
Cadmium-Anreicherung in Neckarfischen
Die Naturwissenschaften 60, 258 (1973).
- (22) Müller, G. & Prosi, F.:
Verteilung von Zink, Kupfer und Cadmium in verschiedenen Organen von Plötzen (*Rutilus rutilus*) aus Neckar und Elsenz
Zeitschr.Naturforsch. 33c, 7 (1978).
- (23) N.N.:
Report on cadmium and freshwater fish
EIFAC Techn.Paper 21 (1977).
- (24) Nordberg, G.F. & Nishiyama, K.:
Whole body and hair retention of cadmium in mice
Arch.Environ.Health 24, 209 (1972).
- (25) Payer, H. & Runkel, K.:
Environmental influences on the accumulation of lead, cadmium, mercury, antimony, arsenic, selenium, bromine and tin in unicellular algae cultivated in Thailand and in Germany
Chemosphere UK 5, 413 (1976).
- (26) Piscator, M.:
Auswirkungen von Cadmium auf die Gesundheit der Bevölkerung
Staub-Reinhaltung-Luft 33, 457 (1973).
- (27) Reuss, J., Dooley, H. & Griffiths, W.:
Plant uptake of cadmium from phosphate fertilizer
Report EPA (Environmental Pesticide Act) 600, 3, 53 (1973).
- (28) Rosmann, K.J. & De Laeter, J.R.:
Low level determination of environmental cadmium
Nature 261, 685 (1976).
- (29) Schleichert, U.:
Bilanzierung und Herkunft toxischer Schwermetalle für das Rheineinzugsgebiet
Ber.Landw. 55, 691 (1977/78).

(30) Schweiger, G.:

Die toxische Einwirkung von Schwermetallsalzen
auf Fische und Fischnährtiere

Arch.Fischereiwiss. 8, 54 (1957).

(31) Thiele, H., Märtens, C. & Schöneburg, T.:

Über die Entdeckung des Cadmiums vor 150 Jahren

Z.Chem. 9, 55 (1969).

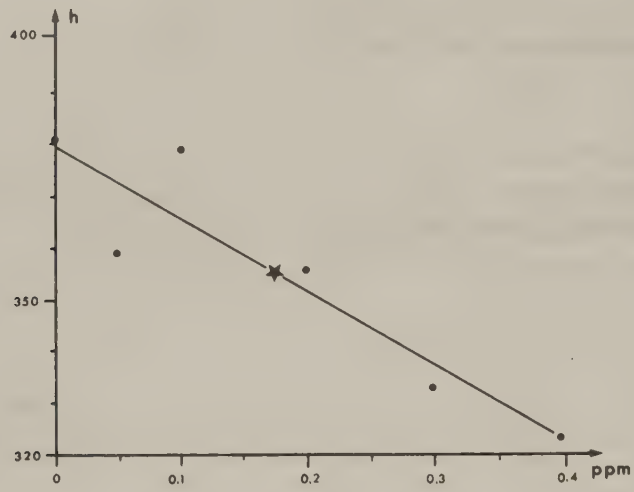
(32) Weiser, M., Lottermoser, A. & Weingarten, H.:

Über die Bestimmung von Cadmium in Fischen aus Kärntner Seen

Wiener tierärztl.Monatszeitschr. 62, 214 (1975).

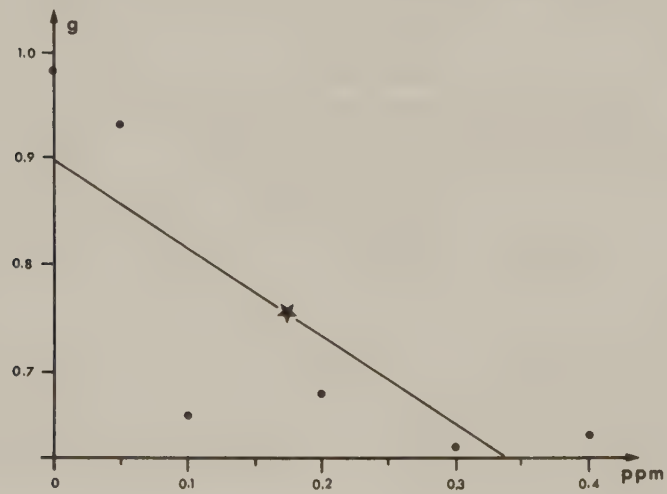
Grafik (1) Korrelation des Schlupftermins
mit der Dosis

$N=6$; $R=-0.94$; $P=0.002$;



Grafik (2) Korrelation des Gewichts der überlebenden Tiere
mit der Dosis

$N=6$; $R=-0.89$; $P=0.009$;



LEGENDEN

Grafik (1): Korrelation der Schlupfrate (Stunden) mit der Cadmiumdosis (ppm); Mittelwerte der 6 Versuchsgruppen: Punkte; Median aller Gruppen: Stern; negative Regressionsgerade bei linearem Abfall der Mittelwerte.

Grafik (2): Korrelation des Körpergewichtes der überlebenden Tiere nach 3 Monaten (Gramm) mit der Cadmiumdosis (ppm); Mittelwerte der 6 Versuchsgruppen: Punkte; Median aller Gruppen: Stern; negative Regressionsgerade bei nicht linearem Abfall der Mittelwerte.

Lebenslauf

Name: Reinhard Sattler

Anschrift: Fährstr. 3, 4100 Duisburg 14

Geburtstag: 24. Oktober 1958

Geburtsort: Duisburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Helmo Sattler, geb. 19 August 1928
Rechtsanwalt
Hiltrud Sattler, geb. 4. Februar 1935

Geschwister: Wolfgang Sattler, geb. 30. November 1965
Jutta Sattler, geb. 8. Dezember 1972

Schulbildung: 1965-1968 Besuch der Friedrich-Brücker-Schule
in Duisburg-Rheinhausen
1968-1977 Besuch des Krupp-Gymnasiums
in Duisburg-Rheinhausen

Schulabschluß: Abitur 1977

Bundeswehrzeit: 1. Juli 1977 Eintritt in die Bundeswehr
als Sanitätsoffizieranwärter,
seit Oktober 1978 beurlaubt zum
Zahnmedizinstudium

Studium: Zahnmedizinstudium in Düsseldorf
vom Wintersemester 1978/79
bis zum Wintersemester 1983/84

Prüfungen: Naturwissenschaftliche Vorprüfung
in Düsseldorf, Oktober 1979
Zahnärztliche Vorprüfung
in Düsseldorf, Februar 1981
Zahnärztliche Prüfung
in Düsseldorf, Oktober 1983.

